

日本国特許庁

PATENT OFFICE  
JAPANESE GOVERNMENT

29.02.00

REC'D 14 APR 2000

WIPO PCT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日

Date of Application:

1999年 3月 1日

出願番号

Application Number:

平成11年特許願第052314号

出願人

Applicant(s):

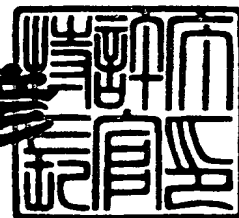
中外製薬株式会社

PRIORITY  
DOCUMENTSUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

2000年 3月31日

特許庁長官  
Commissioner,  
Patent Office

近藤隆彦



出証番号 出証特2000-3021282

【書類名】 特許願

【整理番号】 982072

【提出日】 平成11年 3月 1日

【あて先】 特許庁長官 殿

【国際特許分類】 A61K

【発明者】

【住所又は居所】 東京都豊島区高田 3 丁目 4 1 番 8 号 中外製薬株式会社  
内

【氏名】 佐藤 泰

【特許出願人】

【識別番号】 000003311

【氏名又は名称】 中外製薬株式会社

【代理人】

【識別番号】 100089705

【住所又は居所】 東京都千代田区大手町二丁目 2 番 1 号 新大手町ビル 2  
0 6 区 ユアサハラ法律特許事務所

【弁理士】

【氏名又は名称】 社本 一夫

【電話番号】 03-3270-6641

【選任した代理人】

【識別番号】 100071124

【弁理士】

【氏名又は名称】 今井 庄亮

【選任した代理人】

【識別番号】 100076691

【弁理士】

【氏名又は名称】 増井 忠次

【選任した代理人】

【識別番号】 100075236

【弁理士】

【氏名又は名称】 栗田 忠彦

【選任した代理人】

【識別番号】 100075270

【弁理士】

【氏名又は名称】 小林 泰

【選任した代理人】

【識別番号】 100091638

【弁理士】

【氏名又は名称】 江尻 ひろ子

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 051806

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9705604

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 長期安定化製剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 50℃-1ヶ月間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90%以上であり、かつ 50℃-1ヶ月間の加速試験後又は 60℃-2週間の加速試験後における G-C S F のメチオニン残基酸化体生成率が 1%以下である、安定な G-C S F 製剤。

【請求項 2】 リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む請求項 1 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 3】 疎水性アミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから選択される請求項 2 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 4】 リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む請求項 1 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 5】 フェニルアラニン、アルギニン及びメチオニンを含む請求項 1 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 6】 安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない請求項 1～5 のいずれかに記載の G-C S F 製剤。

【請求項 7】 凍結乾燥製剤である請求項 1～6 のいずれかに記載の G-C S F 製剤。

【請求項 8】 マンニトールをさらに含む請求項 1～7 のいずれかに記載の G-C S F 製剤。

【請求項 9】 界面活性剤をさらに含む請求項 1～8 のいずれかに記載の G-C S F 製剤。

【請求項 10】 界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステ

ルである請求項 9 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 11】界面活性剤がポリソルベート 20 及び／又は 80 である請求項 10 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 12】pH が 5～7 である請求項 1～11 のいずれかに記載の G-C S F 製剤。

【請求項 13】pH が 5.5～6.8 である請求項 12 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 14】pH が 6.5 である請求項 13 記載の G-C S F 製剤。

【請求項 15】G-C S F が CHO 細胞から産生された G-C S F である請求項 1～14 のいずれかに記載の G-C S F 製剤。

【請求項 16】リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pH が 5～7 であることを特徴とする、50℃-1ヶ月間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90%以上である、安定な G-C S F 製剤。

【請求項 17】リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pH が 5～7 であることを特徴とする、50℃-1ヶ月間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90%以上である、安定な G-C S F 製剤。

【請求項 18】pH が 6.5 である請求項 15 又は 16 記載の G-C S F 製剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は G-C S F（顆粒球コロニー刺激因子）製剤に関し、特に長期保存した後も活性成分の損失が少なく、かつ G-C S F のメチオニン残基の酸化体生成

率の低い、安定化させた G - C S F 製剤に関する。

【 0 0 0 2 】

【 従来の技術 】

G - C S F は、好中球の前駆細胞に作用し、その増殖ならびに分化成熟を促進する分子量約 2 万の糖タンパク質である。

【 0 0 0 3 】

本出願人によって、口腔底癌患者の腫瘍細胞から採取した細胞株を培養することにより高純度のヒト G - C S F が精製されて以来、これを契機に、ヒト G - C S F 遺伝子のクローニングに成功し、現在では遺伝子工学的方法によって微生物や動物細胞で組換えヒト G - C S F を大量に生産することが可能になった。また、本願出願人はこの精製した G - C S F の製剤化に成功し、これを感染防御剤として市場に製品を供給している（特許第 2 1 1 6 5 1 5 号）。

【 0 0 0 4 】

G - C S F は極めて微量で使用され、通常成人一人当たり、0. 1 ~ 1 0 0 0  $\mu$  g（好ましくは 5 ~ 5 0 0  $\mu$  g）の G - C S F を含有する製剤を 1 ~ 7 回 / 週の割合で投与する。しかしながら、この G - C S F は例えば注射用アンプル、注射器等の器壁に対し吸着性を示す。また、G - C S F は不安定で、外的因子の影響を受けやすく、温度、湿度、酸素、紫外線等に起因して会合、重合あるいは酸化等の物理的、化学的变化を生じ、結果として大きな活性の低下を招く。

【 0 0 0 5 】

そこで安定な G - C S F 製剤を市場に供給するために種々の処方設計がなされている。例えば、（a）トレオニン、トリプトファン、リジン、ヒドロキシリジン、ヒスチジン、アルギニン、システイン、シスチン、メチオニンから選ばれる少なくとも 1 種のアミノ酸；（b）少なくとも 1 種の含硫還元剤；又は（c）少なくとも 1 種の酸化防止剤；からなる群から選ばれる少なくとも 1 種を含む製剤（特許第 2 5 7 7 7 4 4 号）等が提案されている。また、安定化剤としてポリソルベートなどの界面活性剤を含む G - C S F 製剤がある（特開昭 6 3 - 1 4 6 8 2 6 号）。

【 0 0 0 6 】

また、容器への付着を少なくし、化学的变化を押さえるという観点からは、凍結乾燥製剤とすることが有利であり、マルトース、ラフィノース、スクロース、トレハロース又はアミノ糖を含有したG-C S F凍結乾燥製剤も報告されている(特表平8-504784号)。

#### 【0007】

現在市場に供給されている製品には、これら化学的、物理的变化を抑制するために、安定化剤として一般的に使用されているヒト血清アルブミンあるいは精製ゼラチンなどのタンパク質が添加されているものがある。しかしながら、タンパク質を安定化剤として添加することに関しては、ウィルスのコンタミを除去する等のために非常に煩雑な工程を必要とする等の問題があった。

#### 【0008】

しかしながら、このようなタンパク質を添加しない場合には、G-C S Fのメチオニン残基の酸化体の生成が多くなり、品質劣化をもたらすという問題があった。

#### 【0009】

##### 【発明が解決すべき課題】

本発明の目的は、長期の保存にもより安定で、かつG-C S Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C S F製剤を提供することである。

#### 【0010】

##### 【課題を解決するための手段】

上記目的を達成するために鋭意研究した結果、本発明者らは安定化剤として特定アミノ酸を組み合わせることで、長期保存後もG-C S F残存率が高く、かつG-C S Fのメチオニン残基の酸化体生成率の低いG-C S F製剤となしうることを見だし本発明を完成した。

#### 【0011】

すなわち、本発明は、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下であ

る、安定なG-C S F製剤を提供する。

【0012】

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む前記のG-C S F製剤を提供する。

【0013】

本発明はさらに、疎水性アミノ酸がフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから選択される前記のG-C S F製剤を提供する。

【0014】

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含む前記のG-C S F製剤を提供する。

【0015】

本発明はさらに、フェニルアラニン、アルギニン及びメチオニンを含む前記のG-C S F製剤を提供する。

【0016】

本発明はさらに、安定化剤として、実質的にタンパク質を含まない前記のG-C S F製剤を提供する。

【0017】

本発明はさらに、凍結乾燥製剤である前記のG-C S F製剤を提供する。

本発明はさらに、マンニトールをさらに含む前記のG-C S F製剤を提供する。

【0018】

本発明はさらに、界面活性剤をさらに含む前記のG-C S F製剤を提供する。

本発明はさらに、界面活性剤がポリオキシエチレンソルビタンアルキルエステルである前記のG-C S F製剤を提供する。

【0019】



本発明はさらに、界面活性剤がポリソルベート 20 及び／又は 80 である前記の G-C S F 製剤を提供する。

【0020】

本発明はさらに、pH が 5 ～ 7 である前記の G-C S F 製剤を提供する。

本発明はさらに、pH が 5.5 ～ 6.8 である前記の G-C S F 製剤を提供する。

【0021】

本発明はさらに、pH が 6.5 である前記の G-C S F 製剤を提供する。

本発明はさらに、G-C S F が CHO 細胞から産生された G-C S F である前記の G-C S F 製剤を提供する。

【0022】

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pH が 5 ～ 7 であることを特徴とする、50℃ - 1 ヶ月間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90% 以上であるか、60℃ - 2 週間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90% 以上である、安定な G-C S F 製剤を提供する。

【0023】

本発明はさらに、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、フェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸を含み、pH が 5 ～ 7 であることを特徴とする、50℃ - 1 ヶ月間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90% 以上であるか、60℃ - 2 週間の加速試験後における G-C S F 残存率が 90% 以上である、安定な G-C S F 製剤を提供する。

【0024】

本発明はさらに、pH が 6.5 である前記いずれかの G-C S F 製剤を提供する。

【0025】

【発明の実施の態様】

本発明の製剤に使用するG-C S Fは高純度に精製されたヒトG-C S Fであれば全て使用できる。具体的には、哺乳動物、特にヒトのG-C S Fと実質的に同じ生物学的活性を有するものであり、天然由来のもの、および遺伝子組換え法によって得られたものを含む。遺伝子組換え法によって得られるG-C S Fには天然のG-C S Fとアミノ酸配列が同じであるもの、あるいは該アミノ酸配列の1または複数を欠失、置換、付加したもので前記生物学的活性を有するものを含む。本発明におけるG-C S Fは、いかなる方法で製造されたものでもよく、ヒト腫瘍細胞の細胞株を培養し、これから種々の方法で抽出し分離精製したもの、あるいは遺伝子工学的手法により大腸菌などの細菌類；イースト菌；チャイニーズハムスター卵巣（CHO）細胞、C127細胞などの動物由来の培養細胞などに産生せしめ、種々の方法で抽出し分離精製したものが用いられる。好ましくは大腸菌、イースト菌又はCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。最も好ましくはCHO細胞によって遺伝子組換え法を用いて生産されたものである。

## 【0026】

本発明のG-C S F製剤には好ましくは安定化剤としてヒト血清アルブミンや精製ゼラチンなどのタンパク質を実質的に含まない。

## 【0027】

本発明のG-C S F製剤は、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下であり、従来知られているG-C S F製剤に比べて極めて安定な製剤である。

## 【0028】

本発明のG-C S F製剤の一例は、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ

酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含むG-C-S-F製剤である。

【0029】

さらに、本発明のG-C-S-F製剤の一例としては、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸から成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸、好ましくはフェニルアラニン、トリプトファン及びロイシンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸、及びメチオニンを含み、pHが5～7であることを特徴とする、50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-F残存率が90%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C-S-Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C-S-F製剤である。

【0030】

本発明で用いるアミノ酸は、遊離のアミノ酸ならびにそのナトリウム塩、カリウム塩、塩酸塩などの塩を含む。本発明の製剤には、これらのアミノ酸のD-、L-およびDL-体を含み、より好ましいのはL-体ならびにその塩である。

【0031】

本発明の製剤に添加するアミノ酸の添加量は使用するアミノ酸の種類により、後述する試験方法を用いて好ましい範囲を定めることができる。一般には最終投与量として、0.001～50mg/mlである。例えば、フェニルアラニンでは好ましくは0.1～25mg/ml、さらに好ましくは1～20mg/mlであり、アルギニンでは好ましくは0.1～25mg/ml、さらに好ましくは1～20mg/mlであり、メチオニンでは好ましくは0.001～5mg/ml、さらに好ましくは0.01～4mg/mlである。

【0032】

本発明の製剤には等張化剤として、ポリエチレングリコール；デキストラン、

マンニトール、ソルビトール、イノシトール、グルコース、フラクトース、ラク  
トース、キシロース、マンノース、マルトース、シュクロース、ラフィノース  
などの糖類を用いることができる。マンニトールが特に好ましい。マンニトール  
の添加量は製剤中に  $1 \sim 100 \text{ mg/ml}$ 、さらに好ましくは  $5 \sim 60 \text{ mg/ml}$   
である。

### 【0033】

本発明の製剤には界面活性剤をさらに含むことができる。界面活性剤としては  
、非イオン界面活性剤、例えばソルビタンモノカプリレート、ソルビタンモノラ  
ウレート、ソルビタンモノパルミテート等のソルビタン脂肪酸エステル；グリセ  
リンモノカプリレート、グリセリンモノミリテート、グリセリンモノステアレー  
ト等のグリセリン脂肪酸エステル；デカグリセリルモノステアレート、デカグリ  
セリルジステアレート、デカグリセリルモノリノレート等のポリグリセリン脂肪  
酸エステル；ポリオキシエチレンソルビタンモノラウレート、ポリオキシエチレ  
ンソルビタンモノオレエート、ポリオキシエチレンソルビタンモノステアレート  
、ポリオキシエチレンソルビタンモノパルミテート、ポリオキシエチレンソルビ  
タントリオレエート、ポリオキシエチレンソルビタントリスステアレート等のポリ  
オキシエチレンソルビタン脂肪酸エステル；ポリオキシエチレンソルビットテト  
ラステアレート、ポリオキシエチレンソルビットテトラオレエート等のポリオキ  
シエチレンソルビット脂肪酸エステル；ポリオキシエチレングリセリルモノステ  
アレート等のポリオキシエチレングリセリン脂肪酸エステル；ポリエチレングリ  
コールジステアレート等のポリエチレングリコール脂肪酸エステル；ポリオキシ  
エチレンラウリルエーテル等のポリオキシエチレンアルキルエーテル；ポリオキ  
シエチレンポリオキシプロピレングリコールエーテル、ポリオキシエチレンポリ  
オキシプロピレンプロピルエーテル、ポリオキシエチレンポリオキシプロピレン  
セチルエーテル等のポリオキシエチレンポリオキシプロピレンアルキルエーテル  
；ポリオキシエチエレンノニルフェニルエーテル等のポリオキシエチレンアルキ  
ルフェニルエーテル；ポリオキシエチレンヒマシ油、ポリオキシエチレン硬化ヒ  
マシ油（ポリオキシエチレン水素ヒマシ油）等のポリオキシエチレン硬化ヒマシ  
油；ポリオキシエチレンソルビットミツロウ等のポリオキシエチレンミツロウ誘

導体；ポリオキシエチレンラノリン等のポリオキシエチレンラノリン誘導体；ポリオキシエチレンステアリン酸アミド等のポリオキシエチレン脂肪酸アミド等の HLB 6～18 を有するもの；陰イオン界面活性剤、例えばセチル硫酸ナトリウム、ラウリル硫酸ナトリウム、オレイル硫酸ナトリウム等の炭素原子数 10～18 のアルキル基を有するアルキル硫酸塩；ポリオキシエチレンラウリル硫酸ナトリウム等の、エチレンオキシドの平均付加モル数が 2～4 でアルキル基の炭素原子数が 10～18 であるポリオキシエチレンアルキルエーテル硫酸塩；ラウリルスルホコハク酸エステルナトリウム等の、アルキル基の炭素原子数が 8～18 のアルキルスルホコハク酸エステル塩；天然系の界面活性剤、例えばレシチン、グリセロリン脂質；スフィンゴミエリン等のフィンゴリン脂質；炭素原子数 12～18 の脂肪酸のショ糖脂肪酸エステル等を典型的例として挙げることができる。本発明の製剤には、これらの界面活性剤の 1 種または 2 種以上を組み合わせる添加することができる。

## 【0034】

好ましい界面活性剤はポリオキシエチレンソルビタン脂肪酸エステルであり、特に好ましいのはポリソルベート 20、21、40、60、65、80、81、85 であり、最も好ましいのはポリソルベート 20 及び 80 である。

## 【0035】

本発明の G-C S F 含有製剤に添加する界面活性剤の添加量は、一般には G-C S F 1 重量部に対して 0.0001～10 重量部であり、好ましくは G-C S F 1 重量部に対して 0.01～5 重量部であり、最も好ましくは G-C S F 1 重量部に対して 0.2～2 重量部である。

## 【0036】

本発明の G-C S F 製剤の pH は好ましくは 5～7 であり、さらに好ましくは pH が 5.5～6.8 であり、さらに好ましくは pH が 6～6.7 であり、最も好ましくは pH が 6.5 である。

## 【0037】

本発明の G-C S F 製剤には、所望によりさらに希釈剤、溶解補助剤、賦形剤、pH 調整剤、無痛化剤、緩衝剤、含硫還元剤、酸化防止剤等を含してもよい。

。例えば、含硫還元剤としては、N-アセチルシステイン、N-アセチルホモシステイン、チオクト酸、チオジグリコール、チオエタノールアミン、チオグリセロール、チオソルビトール、チオグリコール酸及びその塩、チオ硫酸ナトリウム、グルタチオン、並びに炭素原子数1～7のチオアルカン酸等のスルフヒドリル基を有するもの等が挙げられる。また、酸化防止剤としては、エリソルビン酸、ジブチルヒドロキシトルエン、ブチルヒドロキシアニソール、 $\alpha$ -トコフェロール、酢酸トコフェロール、L-アスコルビン酸及びその塩、L-アスコルビン酸パルミテート、L-アスコルビン酸ステアレート、亜硫酸水素ナトリウム、亜硫酸ナトリウム、没食子酸トリアミル、没食子酸プロピルあるいはエチレンジアミン四酢酸二ナトリウム（EDTA）、ピロリン酸ナトリウム、メタリン酸ナトリウム等のキレート剤が挙げられる。さらには、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、リン酸ナトリウム、リン酸カリウム、炭酸水素ナトリウムなどの無機塩；クエン酸ナトリウム、クエン酸カリウム、酢酸ナトリウムなどの有機塩などの通常添加される成分を含んでいてよい。

#### 【0038】

本発明のG-C S F製剤は溶液製剤、凍結乾燥製剤、噴霧乾燥製剤などを含む。最も好ましくは凍結乾燥製剤である。

#### 【0039】

本発明の製剤は、これらの成分をリン酸緩衝液（好ましくはリン酸一水素ナトリウム-リン酸二水素ナトリウム系）及び／又はクエン酸緩衝液（好ましくはクエン酸ナトリウムの緩衝液）などの溶液製剤の分野で公知の水性緩衝液に溶解することによって溶液製剤を調製し、あるいはこのようにして調製された溶液製剤を定法により凍結乾燥、又は噴霧乾燥することによって製造できる。

#### 【0040】

本発明の安定化されたG-C S F含有製剤は通常非経口投与経路で、例えば注射剤（皮下注、静注、筋注など）、経皮、経粘膜、経鼻、経肺などで投与されるが、経口投与も可能である。

#### 【0041】

本発明のG-C S F製剤は、通常密封、滅菌されたプラスチックまたはガラス

容器中に収納されており、使用時に純水（注射用滅菌水）に溶解して使用する。

【0042】

本発明の製剤中に含まれるG-C S Fの量は、治療すべき疾患の種類、疾患の重症度、患者の年齢などに応じて決定できるが、一般には最終投与濃度で1～1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、好ましくは10～800  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、さらに好ましくは50～500  $\mu\text{g}/\text{ml}$ である。

【0043】

本発明の製剤は、感染症や癌の化学治療において、抗生物質、抗菌剤、抗癌剤などの薬剤を投与する際に同時投与すると、患者の抵抗力、活性などといった免疫応答力に基づいた防御機能を改善することが判明しており、臨床上極めて有用である。従って、本発明の製剤はこれらの薬剤と併用投与することができる。

【0044】

本発明のG-C S F製剤は後述の実施例に示すように、50℃-1ヶ月間の加速試験又は60℃-2週間の加速試験を行った後にも、極めて良好なG-C S F残存率を示す。また、50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験を行った後にも、G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率がほとんど観察されなかった。本発明のG-C S F製剤は50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上、好ましくは95%以上であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下、好ましくは検出限界以下である。

【0045】

本発明の製剤では、後述する実施例の結果から、リジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、トレオニン、アスパラギンから成る群より選ばれる一種以上のアミノ酸と、疎水性アミノ酸から選ばれる一種以上のアミノ酸を添加することにより特に常温における長期保存後のG-C S F残存率を増加することができ、またメチオニンを添加することにより、G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率を検出限界以下にすることが観察された。本発明者らは、

特定の理論に拘束されるつもりはないが、G-C S Fのメチオニン残基に代えて、添加されたメチオニンが酸化されることにより、G-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率を低くすると推測した。

【0046】

本発明を以下の実施例によってさらに詳しく説明するが、本発明の範囲はこれに限定されない。本発明の記載に基づき種々の変更、修飾が当業者には可能であり、これらの変更、修飾も本発明に含まれる。

【0047】

#### 【実施例】

##### 試験方法

バイアルあたりの各原料の添加量が下記の表1及び表2となるように各調剤液を調製し、無菌濾過を行った後、無菌的に各バイアルに1 mLずつ正確に充填し、凍結乾燥に供した。凍結乾燥終了後、完全打栓し、G-C S F凍結乾燥製剤を製造した。

【0048】



【表 1】

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 1	250 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH7.4
試料 2	250 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 3	100 $\mu$ g	0mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 4	100 $\mu$ g	10mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 5	100 $\mu$ g	0mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 6	100 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

	G-CSF	フェニルアラニン	アルギニン	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 7	250 $\mu$ g	0mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 8	250 $\mu$ g	10mg	0mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 9	250 $\mu$ g	0mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 10	250 $\mu$ g	10mg	10mg	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

	G-CSF	アミノ酸 1	アミノ酸 2	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 11	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	リジン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 12	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	ヒスチジン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 13	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	アルギニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 14	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	アスパラギン酸	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 15	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	グルタミン酸	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 16	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	セリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 17	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	トレオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 18	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	チロシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 19	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	アスパラギン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 20	100 $\mu$ g	フェニルアラニン	グルタミン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

フェニルアラニンの添加量は、いずれも10mg (60mMに相当)  
 アミノ酸 2の添加量は、60mM相当 (アミノ酸 1と等モル)

	G-CSF	アミノ酸 1	アミノ酸 2	メチオニン	マンニトール	ポリソルベート20	pH緩衝剤
試料 21	100 $\mu$ g	アルギニン	アラニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 22	100 $\mu$ g	アルギニン	バリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 23	100 $\mu$ g	アルギニン	ロイシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 24	100 $\mu$ g	アルギニン	イソロイシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 25	100 $\mu$ g	アルギニン	メチオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 26	100 $\mu$ g	アルギニン	トリプトファン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 27	100 $\mu$ g	アルギニン	フェニルアラニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 28	100 $\mu$ g	アルギニン	プロリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 29	100 $\mu$ g	アルギニン	グリシン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 30	100 $\mu$ g	アルギニン	セリン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 31	100 $\mu$ g	アルギニン	トレオニン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 32	100 $\mu$ g	アルギニン	アスパラギン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 33	100 $\mu$ g	アルギニン	グルタミン	0	50mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

アルギニンの添加量は、いずれも10mg (60mMに相当)  
 アミノ酸 2の添加量は、60mM相当 (アミノ酸 1と等モル)

【0049】

【表 2】

	G-CSF	Phe	Arg	Met	Mannitol	Polysorbate20	pH緩衝剤
試料 34	100 $\mu$ g	10mg	10mg	0mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 35	100 $\mu$ g	10mg	10mg	0.1mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5
試料 36	100 $\mu$ g	10mg	10mg	1mg	25mg	0.1mg	リン酸緩衝剤にてpH6.5

【0050】

このように無菌的に調製したG-CSF含有凍結乾燥製剤を、60℃の恒温槽内に2週間あるいは50℃の恒温槽内に1ヶ月間静置した。

【0051】

加速品製剤、及び未加速品製剤は、1 mLの純水で正確に溶解し、下記の方法の試験試料とした。

#### 【0052】

バイアル中のG-CSF含有量(残存率)を下記の方法1に基づき測定した。  
また、バイアル中のG-CSFメチオニン残基酸化体生成率を下記の方法2に基づき測定した。

#### 方法1

試料は、C4逆相カラム(4.6 mm x 250 mm、300オングストローム)を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-CSF含量を測定した。G-CSFとして5 µg相当量を注入し、アセトニトリルのグラジエントによりG-CSFを溶出させ、215 nmの波長で分光学的に検出した。

#### 【0053】

本方法で測定したG-CSF含量を用い、下記の式に基づき、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速後の残存率(%)を算出した。

#### 【0054】

#### 【式1】

$$\text{残存率 (\%)} = \frac{\text{(所定期間の加速後のG-CSF含量)}}{\text{(未加速品のG-CSF含量)}} \times 100$$

#### 【0055】

#### 方法2

試料は、C4逆相カラム(4.6 mm x 250 mm、300オングストローム)を用い、純水、アセトニトリル、トリフルオロ酢酸を移動相に用いた逆相系高速液体クロマトグラフィー法によりG-CSF未変化体及び、G-CSF Met残基酸化体を測定した。アセトニトリルのグラジエントによりG-CSFを溶出させ、215 nmの波長で分光学的に検出した。

#### 【0056】

本方法で測定したG-CSF未変化体及びG-CSF Met 残基酸化体にピーク面積を用い、下記の式に基づき、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速後のG-CSF Met 残基酸化体生成率(%)を算出した。

【0057】

【式2】

$$\text{G-CSF Met 残基酸化体生成率(\%)} = \frac{(\text{G-CSF Met 残基酸化体})}{(\text{G-CSF 未変化体}) + (\text{未加速品の G-CSF 含量})} \times 100$$

【0058】

実施例1：各種pHのG-CSF残存率に及ぼす効果

表1に記載の各種pHで調製した試料1及び試料2を、60℃-2週、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-CSF残存率を方法1に記載の式により算出した。得られた結果を表3に示す。

【0059】

【表3】

	試料.1 pH 7.4	試料.2 pH 6.5
50℃-1ヶ月間	97.7	99.7
60℃-2週間	95.8	97.1

【0060】

pH 7.4 処方に比べて、pH 6.5において、同等あるいはそれ以上の安定性を示した。

実施例2：各種アミノ酸のG-CSF残存率に及ぼす効果(1)

表1に記載の各種アミノ酸を添加して調製した試料3～6(G-CSF含量100μg)、並びに試料7～10(G-CSF含量250μg)を、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-CSF残存率を方法1に

記載の式により算出した。得られた結果を表 4 及び表 5 に示す。

【0061】

【表 4】

100  $\mu$ g G-CSF 含有製剤

	試料.3	試料.4	試料.5	試料.6
フェニルアラニン	無添加	10mg	無添加	10mg
アルギニン	無添加	無添加	10mg	10mg
50℃-1ヶ月間	72.9 %	84.8 %	82.4 %	98.3 %
60℃-2週間	67.2 %	77.9 %	68.8 %	95.0 %

【0062】

【表 5】

250  $\mu$ g G-CSF 含有製剤

	試料.7	試料.8	試料.9	試料.10
フェニルアラニン	無添加	10mg	無添加	10mg
アルギニン	無添加	無添加	10mg	10mg
50℃-1ヶ月間	76.6 %	88.1 %	96.3 %	99.7 %
60℃-2週間	74.0 %	78.1 %	90.7 %	97.1 %

【0063】

いずれの G-C S F 含量においても、アミノ酸無添加処方比べて、フェニルアラニンを単独添加、あるいはアルギニンを単独添加した製剤では安定性が向上しているが、十分ではない。フェニルアラニンとアルギニンを併用することで安定性の顕著な向上が認められた。

### 実施例 3：各種アミノ酸の G-C S F 残存率に及ぼす効果 (2)

表 1 に記載の各種アミノ酸を添加して調製した試料 11～20 (アミノ酸 1 としてフェニルアラニンを、アミノ酸 2 としてリジン、ヒスチジン、アルギニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、セリン、トレオニン、チロシン、アスパラギン及びグルタミンのいずれかを添加)、並びに試料 21～33 (アミノ酸 1 としてアルギニンを、アミノ酸 2 としてアラニン、バリン、ロイシン、イソロイシン、メチオニン、トリプトファン、フェニルアラニン、プロリン、グリシン、セリン、トレオニン、アスパラギン及びグルタミンのいずれかを添加) を、60℃-2

週間、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後のG-C S F残存率を方法1に記載の式により算出した。得られた結果を表6及び表7に示す。

【0064】

【表6】

	50℃-1ヶ月間	60℃-2週間
試料.11	92.8%	91.2%
試料.12	98.8%	97.5%
試料.13	98.0%	96.0%
試料.14	95.7%	96.7%
試料.15	95.6%	94.0%
試料.16	88.4%	87.8%
試料.17	96.4%	90.7%
試料.18	84.6%	81.7%
試料.19	95.0%	95.3%
試料.20	89.8%	87.2%

【0065】

【表7】

	50℃-1ヶ月間	60℃-2週間
試料.21	89.0%	84.4%
試料.22	88.9%	86.5%
試料.23	96.3%	96.2%
試料.24	88.5%	89.3%
試料.25	95.5%	88.5%
試料.26	101.4%	98.6%
試料.27	97.0%	95.7%
試料.28	89.4%	82.5%
試料.29	90.9%	71.2%
試料.30	89.2%	85.2%
試料.31	90.6%	87.3%
試料.32	94.0%	88.6%
試料.33	90.1%	84.6%

【0066】

フェニルアラニンとリジン、フェニルアラニンとヒスチジン、フェニルアラニンとアルギニン、フェニルアラニンとアスパラギン酸、フェニルアラニンとグルタミン酸、フェニルアラニンとトレオニン、フェニルアラニンとアスパラギンの組み合わせ、並びにアルギニンとロイシン、アルギニンとトリプトファン、アルギニンとフェニルアラニンの組み合わせにおいてそれぞれ顕著な長期保存安定性が観察された。

実施例4：アミノ酸添加のG-C S F Met 残基酸化体生成率に及ぼす効果

表2に記載の各量のメチオニンを添加して調製した試料34～36（フェニル

アラニンとアルギニンの量は一定)を、60℃-2週間、及び50℃-1ヶ月間加速試験を行った後に上記方法2で実施したクロマトグラムを図1に示す。また、G-CSF Met 残基酸化体生成率を方法2に記載の式により算出した結果を表8に示す。

【0067】

【表8】

	試料.34 Met 0 mg	試料.35 Met 0.1 mg	試料.36 Met 1 mg
50℃-1ヶ月間	1.2 %	N.D.	N.D.
60℃-2週間	1.7 %	N.D.	N.D.

N.D.: 検出限界以下

【0068】

このように、0.1 mg 以上のメチオニンの添加により、G-CSF Met 残基酸化体の生成を完全に抑制することができた。

【0069】

## 【発明の効果】

本発明のG-CSF製剤は、長期保存後においてもG-CSFの残存率が極めて高く、またG-CSFのメチオニン残基酸化体生成率をほぼ完全に抑制することのできる安定な製剤である。

【0070】

【書類名】 図面

【図 1】

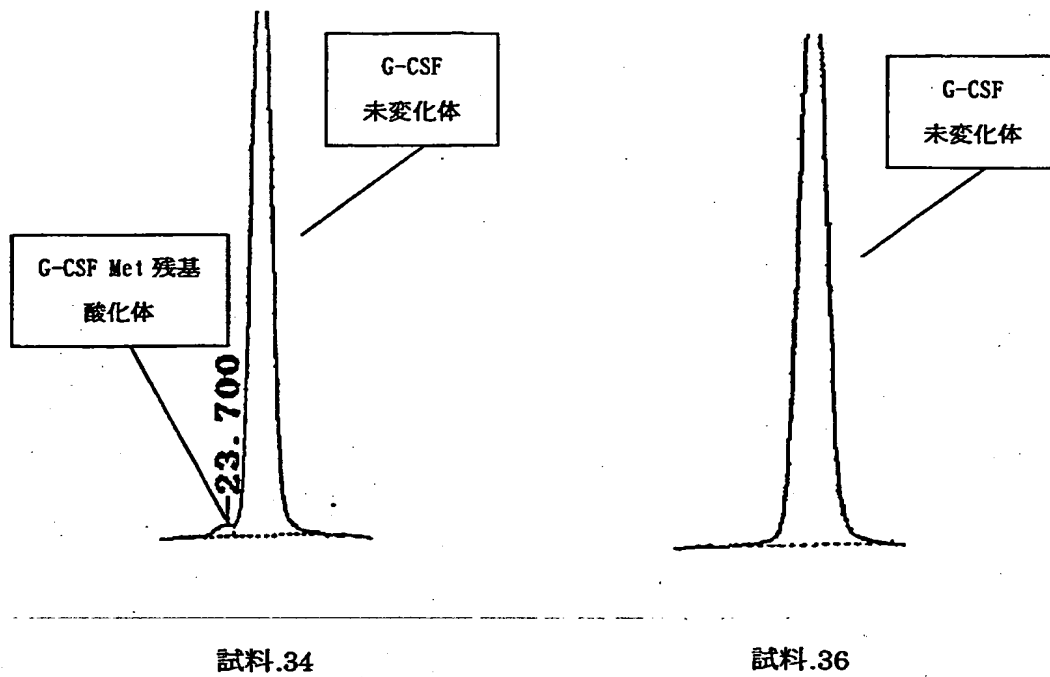


図.1 試料.34, および試料.36 を 60℃・2 週間加速した試料のクロマトグラム。

【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 長期保存後においてもG-C S Fの残存率が高く、またG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が低いG-C S F製剤を提供する。

【解決手段】 50℃-1ヶ月間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%以上であるか、60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S F残存率が90%であり、かつ50℃-1ヶ月間の加速試験後又は60℃-2週間の加速試験後におけるG-C S Fのメチオニン残基酸化体生成率が1%以下である、安定なG-C S F製剤。

【選択図】 なし



出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[000003311]

1. 変更年月日 1990年 9月 5日  
[変更理由] 新規登録  
住 所 東京都北区浮間5丁目5番1号  
氏 名 中外製薬株式会社

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**